云 南 植 物 研 究 5(4): 417—422, 1983
Acta Botanica Yunnanica

702烟草冠瘿系的单细胞克隆及其植株再生

张鉴铭　周建葵
(中国科学院昆明植物研究所)

摘　要

用酶分离了根癌土壤杆菌 702 菌株诱发的烟草冠瘿及其畸胎瘤细胞系的原生质体被培养在修改的 K 及 NT培养液中。当它们长成小细胞团时，转移到不加激素的NT培养基上筛选出T-DNA转化了的细胞形成的细胞团。这样，建立了单细胞克隆的702C烟草冠瘿系及其 702TC 畸胎瘤系。经过15代继代培养，他们全部保持了他们原有的特征并且都含有 nopaline。用这种畸胎瘤的芽进行了分化根的试验，有少数芽长了根得到完整的植株。分别测试了植株的各部分，植株的叶及其冠瘿都含有nopaline，而根中未测出 nopaline。可能根是由丢失了T-DNA的正常细胞长成的。也可能是它的基因未表达。

植物冠瘿是由根癌土壤杆菌(*Agrobecterium tumefaciens*)诱发的一种植物肿瘤。这种细菌的 Ti 质粒能进入植物细胞将其片段即T-DNA整合到宿主细胞的核基因组中，使宿主细胞发生转化，细胞分裂失去控制而形成肿瘤。同时由于T--DNA所带的一些基因的表达，这种肿瘤细胞中产生和累积了一类称之为 opine 的化合物。因此，冠瘿是根癌土壤杆菌作用下的一种天然基因工程，Ti质粒就是这个基因工程的载体。利用Ti质粒作为高等植物人工基因工程运载体的可能性以及通过研究它而阐明高等植物细胞中基因表达的调节和控制的可能性已吸引着人们对冠瘿和Ti质粒进行深入研究[1，2]。

但是根癌土壤杆菌直接诱导得到的冠瘿组织常夹杂着未经转化的正常细胞，它们利用转化了的肿瘤细胞供给的激素能在无外源激素的培养基上生长，所以这样的冠瘿组织往往是混合体。用这样的组织进行研究时，实验结果往往难以分析，得不出明确的结论。例如，从这样的冠瘿组织长成的植株，其中多数不含 nopaline[3]，多数情况下这种植株是从冠瘿组织中未转化的正常细胞长成的。为了从冠瘿组织中排除未经转化的正常细胞，把T-DNA转化过的细胞筛选出来继续进行繁殖建立纯化的冠瘿细胞的无性系，必须进行单细胞克隆。我们用酶分离原生质体的方法对根癌土壤杆菌702 菌株诱导的烟草冠瘿系及其畸胎瘤系进行了单细胞克隆，建立了纯化的烟草冠瘿细胞系 702C 及其畸胎瘤细胞系702TC。并对单细胞克隆后的畸胎瘤的芽作了分化根的试验。

材 料 和 方 法

实验材料： 根癌土壤杆菌(*Agrobecterium tumefaciens*)702菌株诱发的冠瘿[3]，经过15代继代培养以后的702冠瘿系和702 T 畸胎瘤系[4]的细胞用作本实验的材料。

本文于1983年 4 月 2 日收到。

原生质体的分离和培养方法：把冠瘿表层约 2mm 厚的新鲜细胞或畸胎瘤上的畸形芽和叶切下，按照已报道的分离原生质体的方法[5]制备原生质体并进行培养[6]。

原生质体先培养在K或T（修改的NT）培养液[7]中，当细胞团长到直径约为0.5mm时，用滴管转移到不加任何激素的 NT[8]固体培养基上培养，T-DNA 转化过的细胞形成的细胞团具有激素自主生长的特性，因而能在该培养基上生长并被筛选出来。再在不加激素的 NT 或 G[7]培养基上继代培养而形成纯化的702 C 烟草冠瘿系或702TC 畸胎瘤系。

分化的试验是把702TC畸胎瘤的外形较正常的芽（图 1，A）切下转移到NAA含量分别为 1 、 2 、 3 、 4 和 5 ppm 的MS[9]培养基上培养一段时间，再转移到不加激素的培养基上培养。

nopaline的测定*：随机取克隆后的冠瘿新鲜组织，畸胎瘤的芽和叶、植株的叶、冠瘿和根在研钵中研磨后，在8000转/分下离心 5 分钟，取上清液 10μl点样在 whatman 3 号滤纸上，在400V、20mA电流下电泳1.5小时。电泳液为醋酸：甲酸：水（15:5:80），用精氨酸作对照。电泳后滤纸在60°C下烘干，按照Sakaguchi法[10]显色。

结 果 及 讨 论

单细胞克隆的冠瘿系及其畸胎瘤系的建立

用酶分离法从702烟草冠瘿系的细胞得到的原生质体培养在修改的K培养液中，少数细胞能持续地进行细胞分裂，15天后形成约10个细胞组成的小细胞团。再过一个月，细胞团长大到直径约为 0.5mm 时，把它转移到不加任何激素的 NT 培养基上进行筛选培养，一部分细胞团能继续生长。两个月后把直径约为 1mm 的团再转移到不加激素的NT或G培养基，以后每月转接一次，建立了单细胞克隆的烟草冠瘿细胞系（图 1，C）。已继代培养了15代，生长正常。

702 冠瘿细胞的原生质体在T培养液中不如在K培养液中长的好。培养15天后，在K培养液中的已长成约10个细胞的细胞团，而在T培养液中的才刚刚开始分裂。以后未观察到大的进展。仅只在一个瓶中10个月后长成直径约 1mm 大的三个细胞团，转移到不加激素的 NT 培养基上，生长缓慢，培养一个月后体积的增加只有前者的一半。

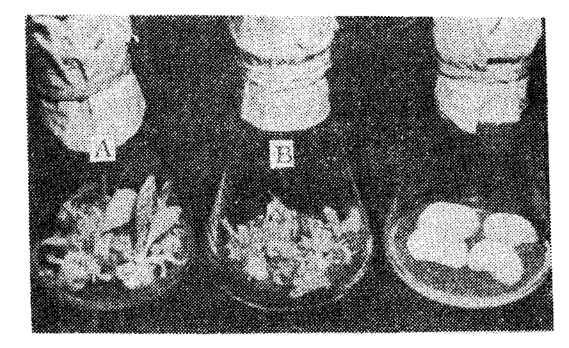


图1　单细胞克隆系 A．702TC外形正常的芽；B.702TC畸胎瘤系；C.702冠瘿细胞系。未注字母的瓶为C。

从 702T 畸胎瘤的芽和叶分离的原生质体在T培养液中，有少数在50天后长成直径约 0.2mm 小细胞团。再加入等量的新

---

* 胡运乾同志对nopaline的测定给予了协助，特此致谢。

鲜培养液，也只有少数细胞团继续生长，一个月后直径达到0.5mm，这时转移到不加激素的 NT 固体培养基上进行筛选培养。在筛选培养中能继续生长的组织20天后变成浅绿色，继而长成它原有的畸胎瘤状态。以后每月转接在不加激素的 NT 或 G 培养基上继代培养，建立了单细胞克隆的 702TC 烟草冠瘿畸胎瘤细胞系（图 1，B）。经10代的继代培养，它们都保持了它的畸胎瘤形态而不长根。有部分畸形的叶和茎会逐渐长大而形成外形较正常的芽（图 1，A）。用这种较正常的芽做分化根的试验。

从未分化的冠瘿细胞经过单细胞克隆得到的是未分化的冠瘿，经过15代的继代培养也未发现再生成畸胎瘤。而已分化畸形芽的畸胎瘤细胞系经过单细胞克隆得到的是畸胎瘤，经过15代的继代培养仍然保持了畸胎瘤的形态。由一个菌种诱发而分离成的两个形态不同的细胞系[4]，在继代培养中及单细胞克隆后保持着这样的稳定性，是否有着稳定的因子在起作用，值得进一步研究。

两个单细胞克隆系都仍含有 nopaline

经过单细胞克隆所建立的冠瘿和畸胎瘤细胞系除具有激素自主生长的特征及原有的形态外，还保持了被转化细胞的代谢特征。根癌土壤杆菌 702 是 nopaline 型的菌株[3]，它诱发的冠瘿细胞中应该含有 nopaline。对单细胞克隆后培养了 9 代的 702C 系、702TC 系、702TC 的较正常的芽以及在加了 NAA 的培养基上培养了一个月的芽进行了 nopaline 的测定。这些组织中都存在nopaline（图 2）。这证明了经过单细胞克隆的所有细胞系都是经过 T-DNA 转化的细胞，在外形较正常的芽中及加 NAA 的培养基上培养了一个月后仍未丢失T-DNA。

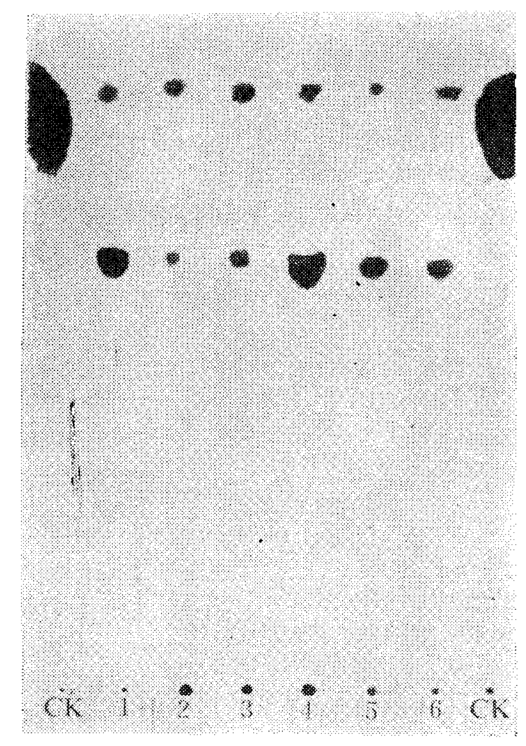


图 2　克隆后的nopaline电泳图 CK，精氨酸；1. 702C；2. 702TC；3. 702TC 较正常的芽；4. 702TC 芽在 1ppm NAA 培养基上；5. 702TC 芽在 3ppm NAA 培养基上；6. 702TC 芽在 5ppm 培养基上。下排的点为nopaline。

冠瘿细胞的原生质体培养初期需要外源激素

由根癌土壤杆菌诱发的冠瘿及畸胎瘤组织中含有较多的激动素类型的激素[11—13]及生长素[14]。似乎可以设想利用冠瘿激素自主生长的特性，在冠瘿组织分离成单个的原生质体以后就可以用不加外源激素的培养基筛选出冠瘿细胞。在我们的实验中，在不加激素的培养液中冠瘿和畸胎瘤的原生质体仅只能存活几天，虽观察到一些初期生长和个别细胞分裂的现象，但都没有持续的细胞分裂，不能长成细胞团。在加了激素的K或 NT 培养液中，它们的原生质体能持续进行细胞分裂而长成冠瘿和畸胎瘤。这与别人在培养爬山虎(*Parthenocissus tricupidata*)冠瘿细胞的原生质体初期需

要外源激素的结果[15]相同。这很可能是由于激素会从刚分离的原生质体大量外渗的原因所致。

每个细胞团是从完全分离开的单个原生质体经过细胞分裂而形成的。这些细胞团或是由转化过的冠瘿或畸胎瘤细胞组成，或是由正常细胞组成的单一的细胞团，而不是混合体。由T-DNA转化过的细胞组成的细胞团是激素自主的，由正常细胞组成的细胞团需要外源激素，因而不能在无激素的培养基上继续生长。原生质体培养初期加入外源激素，而在形成小细胞团时再用不加激素的培养基筛选应不会影响筛选的效果。测定结果表明，筛选出来的冠瘿和畸胎瘤都含有nopaline。

根的分化及完整植株的生长

把单细胞克隆的畸胎瘤上较正常的芽切下转移到含有不同浓度NAA的培养基上培养一个月，或连续在含有NAA的培养基上培养两次再转移到无激素的培养基上，有少数能分化出根形成完整植株（图3）。另外，继代培养的畸胎瘤在第12代中也发现有一株芽长出根。长根的植株在根茎交界处仍形成冠瘿组织。对这种植株的叶、冠瘿组织及根分别进行了nopaline的测定，在所有植株的叶及冠瘿组织中都含有nopaline，而根中都未测出nopaline（表1，图4）。

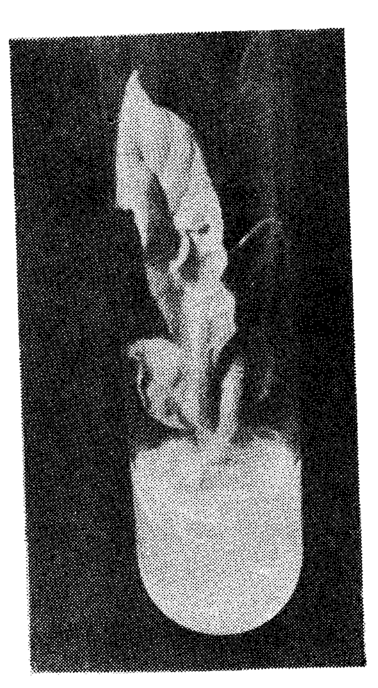


图3 完整植株

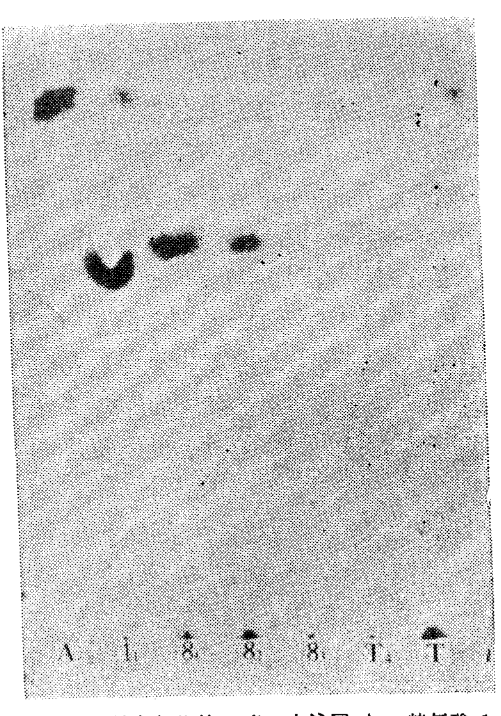


图4 长根植株各部位的nopline电泳图 Arg，精氨酸；1_1和8_1植株的叶，8_2，新生的冠瘿；8_3，植株的根；T_4，正常的愈伤组织；T，正常植株的叶。

表 1　　植 株 各 部 分 nopaline 的 测 定

植株号	培养基转移情况	nopaline 测定			备　　注
		叶	根茎间的冠瘿	根	
1	NT_1*→NT_0→MS_0	++**	++	−	无主根，根系很发达。
2	NT_1→NT_0	++	++	−	有主根，根系很发达。
3	NT_2→MS_1→MS_0	++			
4	NT_4→MS_0	++			
5	NT_5→MS_4→MS_0	++			
6	702TC第12代	++			
7	NT_1→NT_0	++	+	−	直接从茎上长出根
8	702TC第12代的分株	++	++	−	茎较长。分株后长出很好的根系。

* NT、MS为培养基的基本成分，右下角数字为NAA的浓度ppm。

** 与精氨酸显色深度相比较，++表示约为1mg/ml nopaline，+为0.5mg/ml以下，—未测出。

以上实验结果表明，在分化了根的植株的叶及它再生长的冠瘿组织中 T-DNA 仍然保存，而在分化成根的细胞中 T-DNA 可能已丢失，或基因未表达。可以设想，这是在培养过程中有极少数细胞丢失 T-DNA 变成了正常细胞，它在正常细胞分化根的条件下长成了根。这样看来，被转化了的细胞如何分化根？是否只有丢失 T-DNA 的细胞才能形成根？是不是它的基因未表达？这是值得深入研究的问题。

参 考 文 献

〔1〕 Jean L. Manx, 1979; Crown gall disease, nature as genetic engineer. Science, 203: 254—255.

〔2〕 Drummond M., 1979: Crown gall disease. *Nature*, 281: 343—346.

〔3〕 王钧，万石双，李英，1981：植物冠瘿的诱导培养和植株再生。云南植物研究，3（4）：441—448.

〔4〕 张鉴铭，1983：烟草原生质体再生的愈伤组织与冠瘿组织分化的比较。云南植物研究，5（1）：121—125。

〔5〕 张鉴铭，匡安秀，1980：植物原生质体的纯化。云南植物研究，2（3）：315—318。

〔6〕 张鉴铭，1981：花烟草叶肉原生质体生成植株。植物学报，23（6）：496—498。

〔7〕 张鉴铭，1982：培养矮牵牛叶肉原生质体的几种较好的培养基。云南植物研究，4（1）：77—82。

〔8〕 Nagata T. and I. Takebe, 1971: Planting of isolated tabacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta*, 99: 12—20.

〔9〕 Murashige T. and F. Skoog, 1962: A revised medium for rapid growth and bioassay with tabacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473—497.

〔10〕 Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Vol. 1:93 (by Ivol Smith, 1976).

〔11〕 Tegley J. R., F. H. Witham, M. Krasnuk, 1971: Chromatographic analysis of a cytokinin from tissue culture of crown-gall. *Plant Physiol.*, 47: 581—585.

〔12〕 Peterson J. B., C. Miller, 1976: Cytokinin in Vinca rosca L. crown gall tumor tissue as influenced by compounds containing reduced nitrogen. *Plant Physiol.*, 57: 393—399.

〔13〕 Scott L. M., G. Browning and J. Eogles, 1980: Ribosylzeatin and zeatin in tabacco crown gall tissue. *Planta*, 147: 269—273.

〔14〕 Penglly W. and F. Meins, 1977: Specific radioimmunoassay for nanogram quantities of the auxin indole-3-acetic acid. *Planta*, 136: 173—180.

〔15〕 Scowcroft, W. R. M., R., Davey and T. B. Power, 1973: *Plant Sci. Lett.*, 1:451.

SINGLE CELL CLONING OF TOBACCO CROWN GALL TUMOUR STRAIN 702 AND ITS PLANT REGENERATION

Zhang Jianming and Zhou Jiankui
(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica)

Abstract

The Protoplasts were isolated enzymatically from tobacco crown gall tumors and its teratoma cells induced by *Agrobecterium tumefaciens* strain 702. Small colonies ware derived from them by incubating these protoplasts in modified K and NT liquid media. T-DNA transformed-cell colonies were selected by transferring them onto NT medium without any phytohormone. Then single cell cloning strain of tobacco crown gall tumor 702c and its teratoma 702Tc have been established. Through being subcultured 15 times they all maintain their inherent characrts and contain nopaline. Being carried on root differentiate experiment with this teratoma shoots, roots grow from a few of them and intact plants were obtained. Examining each parts of the plants separately, nopaline was present in all leaves and crown galls but was not detected in the roots. The roots perhaps grow from normal cells losing T-DNA. Its genes also perhaps do not express.